

## 缢蛏 $\beta$ -ACTIN 1 基因的分子特性及其表达分析

冯冰冰<sup>1</sup>, 钟玉民<sup>1</sup>, 牛东红<sup>1</sup>, 陈慧<sup>2</sup>, 林国文<sup>2</sup>, 李家乐<sup>1,3\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306;

2. 福建省闽东水产研究所, 福建 宁德 352100;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306)

**摘要:** 为研究缢蛏功能基因的表达调控, 利用 SMART cDNA 文库构建试剂盒成功构建了缢蛏肝脏组织的标准化 cDNA 文库。对随机选取的 5 679 个克隆进行随机测序, 比对、筛选出 2 条  $\beta$ -actin 同源序列, 对其中一条 EST 序列两端进行扩增、测序, 然后进行 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 扩增、测序, 拼接得到全长 cDNA 序列, 命名为  $\beta$ -ACTIN 1。该序列全长为 1 552 bp, 包括 73 bp 的 5' 非翻译区和 348 bp 的 3' 非翻译区, 以及 1 131 bp 的开放阅读框。阅读框共编码 376 个氨基酸, 推算分子量约为 41.95 ku, 理论等电点为 5.23。与其他 7 种软体动物的氨基酸序列进行比对发现,  $\beta$ -ACTIN 1 基因的氨基酸序列中 Ile179、Glu229、Ser232、Pro236、Ile248、Asn272、Cys273、Val283、Ser320、Ser325、Val330、Pro339 等 12 个氨基酸残基具有特异性; 同时发现缢蛏  $\beta$ -ACTIN 1 氨基酸序列与其他软体动物的相似性高达 97% 以上。系统进化分析显示, 缢蛏首先与软体动物聚在一起, 然后与节肢动物聚在一起, 再依次与鱼类、两栖类、哺乳类聚在一起。荧光定量 PCR 检测结果显示,  $\beta$ -ACTIN 1 基因在缢蛏各组织中的表达及鳃弧菌诱导后的表达均不稳定, 不适合作为内参基因。

**关键词:** 缢蛏; cDNA 文库;  $\beta$ -ACTIN 1 基因; 序列分析; 基因表达

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标识码:** A

肌动蛋白 (actin) 在细胞中无处不在, 几乎参与了真核细胞的所有生理过程<sup>[1-3]</sup>, 如对肌肉收缩、生长调节、结构稳定、胞内和胞外分泌等<sup>[4-8]</sup>。根据等电点的不同, 真核生物肌动蛋白家族由 6 个亚型组成:  $\alpha$  和  $\gamma$  平滑肌、 $\alpha$  心肌、 $\alpha$  骨骼肌、 $\beta$  和  $\gamma$  细胞浆肌动蛋白<sup>[9]</sup>。软体动物头足类中已经检测出有  $\alpha$  和  $\beta$  两类 actin 基因, 并且运用这两类 actin 序列的片段进行了系统进化研究<sup>[10]</sup>, 而腹足类和双壳类该基因的种类尚不清楚。在上述基因中, 因  $\beta$ -actin 的氨基酸序列存在高度的保守性, 软体类、节肢类、鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类等不同类群动物  $\beta$ -肌动蛋白氨基酸序列同源性均在 96% 以上<sup>[11]</sup>, 且其 mRNA 的表达几乎不随年龄增长而变化, 因而在测定某种 mRNA 的表达量时, 常采用  $\beta$ -actin mRNA 作为参照<sup>[12]</sup>。但近年

来也有研究认为,  $\beta$ -actin 基因不适合作为内参基因<sup>[13-14]</sup>。

缢蛏 (*Sinonovacula constricta* Lamarck) 俗名蛏子、蜻子, 属于双壳纲 (Bivalvia)、帘蛤目 (Veneroidea)、截蛏科 (Solecurtidae)、缢蛏属 (*Sinonovacula*)<sup>[15]</sup>, 是中国、日本、韩国特有种类。缢蛏作为我国四大养殖贝类之一, 其自然分布于河口或有少量淡水注入的内湾潮间带中、下区软泥滩上, 在浙江和福建一带已有数百年的养殖历史。本实验室构建了缢蛏肝脏组织的标准化 cDNA 文库<sup>[16]</sup>, 并从中筛选出 2 条  $\beta$ -actin EST 序列, 对其中一条两端进行扩增及 5' RACE 末端扩增并测序, 得到  $\beta$ -actin cDNA 全长序列, 命名为  $\beta$ -ACTIN 1。旨在研究缢蛏  $\beta$ -actin 基因是否适合作为内参基因, 为该物种其他基因的量化研究提

收稿日期: 2010-12-21 修回日期: 2011-03-19

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA10A410); 福建省海洋与渔业局重点项目 (闽海鱼 2007015); 上海高校创新团队建设项目

通讯作者: 李家乐, E-mail: jlle@shou.edu.cn

供可靠内参的基础数据,同时也可揭示物种进化提供新信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

缢蛏采自福建省宁德市漳湾镇二屿村沿海滩涂,为野生 1 龄。于 2010 年 4 月带回实验室,取一部分个体的水管、鳃、斧足、外套膜、肝脏、性腺共 6 个组织,按 TaKaRa 的 RNAiso Plus 方法分别提取各组织的总 RNA。同时取另一部分缢蛏在充气过滤海水箱中暂养两周(水温 18 ~ 20 °C),然后用福尔马林灭活的鳃弧菌(由农业部上海海洋大学水生动物病原库提供)攻毒,具体方法如下:使用 PBS 缓冲液清洗灭活鳃弧菌 3 次后,用 PBS 制成细菌悬液(终浓度为 OD<sub>600</sub> = 0.4),每只缢蛏在斧足内注射 50  $\mu$ L 该悬液,然后放回水箱中继续暂养,12 h 后,正常组(未注射细菌悬液)和诱导组(注射细菌悬液)同时取样,包括:水管、鳃、斧足、外套膜、肝脏、性腺共 6 个组织。然后提取各个样品的总 RNA。

### 1.2 缢蛏 $\beta$ -ACTIN 1 基因全长 cDNA 的克隆和序列测定

根据缢蛏肝脏 cDNA 标准化文库中 EST 序列比对的结果,选取一条与其它生物的  $\beta$ -actin 基因具有高度相似性的 EST 序列,以文库质粒为模板,利用通用引物 M13F 和 M13R(表 1)对其扩增并测序,得到  $\beta$ -actin 基因的部分 cDNA 序列,包括部分开放阅读框和完整的 3' UTR。然后使用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage<sup>®</sup> 2PCR Enzyme System 试剂盒进行 5'RACE 末端扩增,用 Primer primer 5.0 设计下游特异引物  $\beta$ r,试剂盒中的 UPM 为上游引物(表 1)。扩增 5' 端的 PCR 反应参数:94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,68 °C 30 s,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测,用 TIANgel Midi Purification Kit 回收目的片段 PCR 产物,连入克隆载体 pMD19-T,转化到感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,所获得的阳性克隆由上海生工生物技术有限公司进行序列测定。

表 1 引物序列表  
Tab. 1 Sequences of primer

引物 primer	序列(5'-3') sequence	产物长度/(bp) product length
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	1 338
M13R	AAACAGCTATGACCATGTTC	
$\beta$ r	GTGAGGGAGGGCGTAACCTTCGT	595
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT(Long) CTAATACGACTCACTATAGGGC(Short)	
$\beta$ -actin-F	CAGGTATTGCCGACAGA	139
$\beta$ -actin-R	TGGAAGGTGGACAGAGA	
18S-F	TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT	220
18S-R	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	

然后将  $\beta$ -actin 基因质粒扩增 PCR 产物序列和 5'RACE 末端扩增 PCR 产物序列进行拼接,获得缢蛏  $\beta$ -actin 基因的全长 cDNA 序列,命名为  $\beta$ -ACTIN 1。

### 1.3 缢蛏 $\beta$ -ACTIN 1 基因序列与氨基酸序列的同源性分析及分子进化分析

将获得的  $\beta$ -ACTIN 1 基因的全长 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白数据库做 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 分析。应用 ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 确定正确的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)并推导其编码的氨基酸序列。ProtParam 程序(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测氨基酸序列的物理参数,Scratch 程序(<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/index.html>) 预测二硫键,SignalP 3.0server 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>) 预测信号肽,PSORT II Prediction 程序(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>) 基于其氨基酸序列预测蛋白质亚细胞定位点。

然后将  $\beta$ -actin 基因质粒扩增 PCR 产物序列和 5'RACE 末端扩增 PCR 产物序列进行拼接,获得缢蛏  $\beta$ -actin 基因的全长 cDNA 序列,命名为  $\beta$ -ACTIN 1。

BLASTp 于 GenBank 中进行相似性检索, ClustalX 软件对相应的氨基酸序列进行分析。然后用 MEGA 4.0 软件 Neighbor-Joining 法构建 17 种物种  $\beta$ -actin 氨基酸序列的系统进化树, 采用 Bootstrap 重复 1 000 次计算各分支的置信度。

#### 1.4 缙蛭 $\beta$ -ACTIN 1 基因在各组织中表达分析

参照 TaKaRa 的 Primescript™ RT-PCR Kit 中 RT-PCR 体系, 反转录水管、鳃、斧足、外套膜、肝脏、性腺共 6 个组织的总 RNA, 然后进行荧光定量 PCR 检测。

用 Primer primer 5.0 设计荧光定量引物, 检测前先对设计的荧光定量引物进行筛选, 只有扩增效率为 80% ~ 120%、无非特异性扩增产物、扩增产物与模板量线性关系良好的引物才用于下一阶段的检测, 检测中的内参基因为 18S rRNA。各引物序列列于表 1。

荧光定量检测试剂采用 SYBR 定量检测试剂盒 (Takara)。采用 20  $\mu$ L 反应体系, 内含 Mix 10  $\mu$ L、正反引物 (10 mmol/L) 各 0.6  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L 及模板 cDNA 2  $\mu$ L。反应程序为 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 随后进行溶解曲线检测。所得数据采用 SPSS 16.0 软件进行 *t*-test 统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同组织的总 RNA 及 $\beta$ -ACTIN 1 基因的 PCR 产物鉴定

对提取的水管、鳃、斧足、外套膜、肝脏、性腺 6 个组织的总 RNA 进行电泳分析、OD 值检测。用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 检测完整性。质粒扩增 PCR 产物和 5'RACE 的产物分别约为 1 400 bp 和 600 bp。

```

1          actgttgataagaactcttgggcagaaaggaacattagcactaggatcaatctaaagaacaataactgacaaac
74 ATGGCTGATGAAGACGTTGCCGCTCTGGTCGTAGACAATGGATCTGGTATGTGCAAGCCGATTCCGCCGAGACGATGCTCCAAGAGCC
  M A D E D V A A L V V D N G S G M C K A G F A G D D A P R A
164 GTGTTCCATCCATCGTCGGTCGCCCAAGACATCAGGGTGTGATGGTGGTATGGGCCAGAAAGACAGCTATGTTGGAGATGAGGCCAG
  V F P S I V G R P R H Q G V M V G M G Q K D S Y V G D E A Q
254 AGCAAGAGAGGTATCCCTCAACCCCAAGTACCCCATCGACACGGCATCGTACCAACTGGGACGATATGGAGAAGATCTGGCATCACACC
  S K R G I L T L K Y P I E H G I V T N W D D M E K I W H H T
344 TTCTACAACGAGCTCCGTGTAGCCCTGAGGAACACCCAGTCTGCTCACTGAAGCTCCTCTTAACCCCTAAGGCCAACAGGGAAGATG
  F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M
434 ACCCAGATCATGTCGAGACCTTAAACCCCTGCTATGTACGTCGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCTGTACGCCCTCCGGTCGTACCCACC
  T Q I M F E T F N T P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R T T
524 GGTATTGTGATGGAAGTCTGGTATGGTGTGCCACACTGTACCCATCTACGAAGGTTACGCCCTCCCTACGCCATTATGCGTATTGAT
  G I V M D S G D G V S H T V P I Y E G Y A L P H A I M R I D
614 TTAGCAGGTAGAGATCTAAGTACTACCTCATGAAGATTTTGACCGAAAGAGGCTACTCCTTCACTACGACGCTGAGCGTGAGATTGTC
  L A G R D L T D Y L M K I L T E R G Y S F T T T A E R E I V
704 AGAGACATTAAGGAGAAGCTGTCTATGTGCTCTGGAATTTGAACAAGAGATGGAACTGCTTCTATCTCCAGCCCTCTTGAGAAGACC
  R D I K E K L C Y V A L D F E Q E M E T A S S S S P L E K S
794 TATGAGCTGCCCGACGGTCAAATCATCACCATTGGTAACGAGCGATTCCGCTGCCAGAGGCAATGTTCCAGCCATCCTTCTGGGATG
  Y E L P D G Q I I T I G N E R F R C P E A M F Q P S F L G M
884 GAGAAGTGTGGTATCCACGAGACCCTACAACAGTGTATGAAGTGGCAGCTTGACATCCGTAAGACTTGTATGCCAACACTGTCTTG
  E N C G I H E T T Y N S V M K C D V D I R K D L Y A N T V L
974 TCAGGAGGTACCACGATGTACCCAGGTATTGCCGACAGAATGCAGAAGGAGATTACCTCCCTTGCCCATCCTCAATGAAGATCAAGGTC
  S G G T T M Y P G I A D R M Q K E I T S L A P S S M K I K V
1064 ATTGCTCCCCAGACGCAATACCCCGTCTGGATCGGTGGTTCATCTGCGCTCTCTGTCCACCTCCAGCAGATGGATCAGTAAG
  I A P P E R K Y P V W I G G S I L A S L S T F Q Q M W I S K
1154 CAGGAGTACGAGTCCGCCCATCTATTGTCCACAGGAAGTCTTCTAAcgaataactatcttgaactttgctcaataaaaaac
  Q E Y D E S G P S I V H R K C F *
1244 ctgacagaaagattaaatcattagcaaatatccatggacaaaattgttattttaaagcagatacttgttttaacgtatcttgaattt
1334 cegggtattaagcagatatttttaacttcitacatgacagcttcacaatcaataaatgcttcaatcaacaaatggtccttcttt
1424 aacacgatgttattttgtatggatctatacagatccactctgttgcagttgctgtgtgacagatagttttataaacaatgtgtat
1514 accaaatataaaagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 缙蛭  $\beta$ -ACTIN 1 编码基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

小写字母代表 3', 5' 端非翻译区; 大写字母部分为编码区, 且上面为核苷酸序列, 下面为氨基酸序列; 方框标出的是多聚腺苷酸加尾信号位点 AATAAA; \* 表示终止密码子。

Fig. 1 Full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of  $\beta$ -ACTIN 1 from *S. constricta*

3', 5' untranslated regions are shown as lowercases; Coding region is shown as uppercases, where the upper sequence indicates the nucland the lower shows the amino acids; Putative polyadenylation signals (AATAAA) are boxed; Stop codon is marked with asterisk (\*).

## 2.2 缢蛏 $\beta$ -ACTIN 1 基因 cDNA 全长序列的特征

扩增测序得到缢蛏  $\beta$ -ACTIN 1 基因的全长 cDNA 序列,推导获得其氨基酸序列。获得的 cDNA 序列全长 1 552 bp (GenBank 登录号: HQ693080)。5'UTR 为 73 bp,3'UTR 为 348 bp,开放阅读框长度为 1 131 bp,可编码 376 个氨基酸,GC 含量为 52.1%。图 1 中 AATAAA 为推测的多聚腺苷酸加尾信号位点。

## 2.3 缢蛏 $\beta$ -ACTIN 1 基因氨基酸的序列特征

推导得到的氨基酸共有 376 个,预测得到的

氨基酸分子量大约为 41.95 ku,理论等电点为 5.23。谷氨酸 (Glu) 和甘氨酸 (Gly) 含量最高为 7.4%,色氨酸 (Trp) 含量最少为 1.1% (图 2)。带负电荷氨基酸残基 (Asp + Glu) 50 个,带正电荷氨基酸残基 (Arg + Lys) 37 个。脂肪族氨基酸指数为 78.59,原子总量 5 843,分子式为  $C_{1855}H_{2905}N_{493}O_{565}S_{25}$ 。缢蛏  $\beta$ -ACTIN 1 基因的氨基酸含有 6 个半胱氨酸 (Cys),形成 2 个二硫键,分别连接第 273 位和第 286 位,第 218 位和第 258 位的半胱氨酸 (Cys)。信号肽预测结果显示无信号肽,蛋白质亚细胞定位为细胞骨架 (44.4%)。

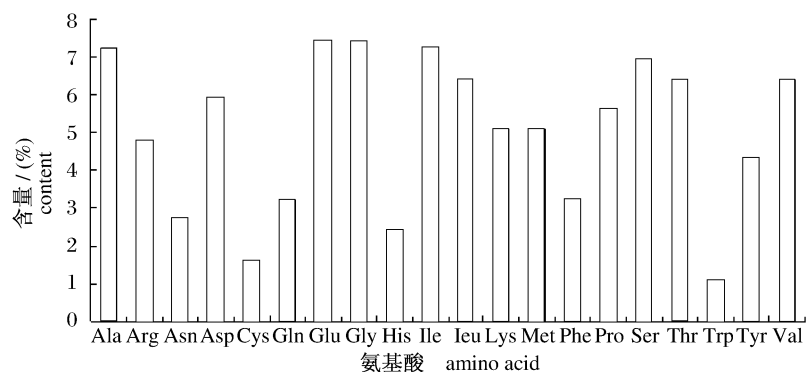


图 2 缢蛏  $\beta$ -ACTIN 1 基因的氨基酸组成

Fig. 2 Amino acid composition of  $\beta$ -ACTIN 1 gene from *S. constricta*

用 Bioedit<sup>[17]</sup> 软件将缢蛏  $\beta$ -ACTIN 1 基因的氨基酸序列与其他 7 种软体动物的  $\beta$ -actin 氨基酸序列进行多序列比对结果见图 3。上述软体动物 N - 末端保守序列 Ala-Leu-Val-Val-Asp-Asn-

Gly-Ser-Gly 的上游和下游分别是 Ala 和 Met 残基,表示 *actin* 基因与胞质肌动蛋白异性体有密切关系<sup>[4,18]</sup>。

<i>Loligo pealei</i>	-MDDEVAALYIDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGMVGMGQKDSYVGDEAQ	59
<i>Chlamys farreri</i>	MCDDVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGMVGMGQKDSYVGDEAQ	60
<i>Crassostrea ariakensis</i>	MGEEDI AALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGMVGMGQKDSYVGDEAQ	60
<i>Crassostrea gigas</i>	MGDEEVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGMVGMGQKDSYVGDEAQ	60
<i>Haliotis diversicolor</i>	-MDDVAALYCDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGMVGMGQKDSYVGDEAQ	59
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	MCDDVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGMVGMGQKDSYVGDEAQ	60
<i>Pinctada fucata</i>	MCDEVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGMVGMGQKDSYVGDEAQ	60
<i>Sinonovacula constricta</i>	MADEDVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGMVGMGQKDSYVGDEAQ	60
Consensus	aa l v d n g s g m c k a g f a g d d a p r a v f p s i v g r p r h q g m v g m g q k d s y v g d e a q	
<i>Loligo pealei</i>	SKRG ILTLKYP I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M	119
<i>Chlamys farreri</i>	SKRG ILTLKYP I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M	120
<i>Crassostrea ariakensis</i>	SKRG ILTLKYP I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M	120
<i>Crassostrea gigas</i>	SKRG ILTLKYP I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M	120
<i>Haliotis diversicolor</i>	SKRG ILTLKYP I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M	119
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	SKRG ILTLKYP I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M	120
<i>Pinctada fucata</i>	SKRG ILTLKYP I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M	120
<i>Sinonovacula constricta</i>	SKRG ILTLKYP I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M	120
Consensus	s k r g i l t l k y p i e h g i v t n w d d m e k i w h h t f y n e l r v a p e e h p v l l t e a p l n p k a n r e k m	
<i>Loligo pealei</i>	TQIMFETFNPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSHVTVP IYEGYALPHA I L R L D	179
<i>Chlamys farreri</i>	TQIMFETFNSPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVFDAGDGVSHVTVP IYEGYALPHA I L R L D	180
<i>Crassostrea ariakensis</i>	TQIMFETFNSPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSHVTVP IYEGYALPHA I M R L D	180
<i>Crassostrea gigas</i>	TQIMFETFNAPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSHVTVP IYEGYALPHA I L R L D	180

<i>Haliotis diversicolor</i>	TQIMFETFNAPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAIMRLD	179
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	TQIMFETFNAPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLD	180
<i>Pinctada fucata</i>	TQIMFETFNAPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLD	180
<i>Sinonovacula constricta</i>	TQIMFETFNAPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVMDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAIMR	180
Consensus	tqimfetfn pamyvaiqavlslyasgrttgiv d gdgv htvpiegyalphi r d	
<i>Loligo pealei</i>	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMQTAASSSSLEKS	239
<i>Chlamys farreri</i>	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMQTAASSSSLEKS	240
<i>Crassostrea ariakensis</i>	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMQTAASSSSLEKS	240
<i>Crassostrea gigas</i>	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMQTAASSSSLEKS	240
<i>Haliotis diversicolor</i>	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLAYVALDFEQEMQTAASSSSLEKS	239
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMQTAASSSSLEKS	240
<i>Pinctada fucata</i>	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMQTAASSSSLEKS	240
<i>Sinonovacula constricta</i>	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMQTAASSSSLEKS	240
Consensus	lagrdltdy lmkil tergysftttaereivrdikeklcyvaldf eqemqta assssleks	
<i>Loligo pealei</i>	YELPDGQVITIGNERFRCPPEALFQPSFLGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLANTVL	299
<i>Chlamys farreri</i>	YELPDGQVITIGNERFRCPPEALFQPSFLGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLANTVL	300
<i>Crassostrea ariakensis</i>	YELPDGQVITIGNERFRCPPEALFQPSFLGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLANTVL	300
<i>Crassostrea gigas</i>	YELPDGQVITIGNERFRCPPEALFQPSFLGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLANTVL	300
<i>Haliotis diversicolor</i>	YELPDGQVITIGNERFRCPPEALFQPSFLGMEAAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLANTVL	299
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	YELPDGQVITIGNERFRCPPEALFQPSFLGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLANTVL	300
<i>Pinctada fucata</i>	YELPDGQVITIGNERFRCPPEALFQPSFLGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLANTVL	300
<i>Sinonovacula constricta</i>	YELPDGQVITIGNERFRCPPEALFQPSFLGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLANTVL	300
Consensus	yelpdgq vitignerfr cppealfqpsflgme sagihettyns imkcdvdirkdlyantvl	
<i>Loligo pealei</i>	SGGSTMFPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	359
<i>Chlamys farreri</i>	SGGSTMFPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	360
<i>Crassostrea ariakensis</i>	SGGSTMFPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	360
<i>Crassostrea gigas</i>	SGGSTMFPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	360
<i>Haliotis diversicolor</i>	SGGSTMFPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	359
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	SGGSTMFPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	360
<i>Pinctada fucata</i>	SGGSTMFPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	360
<i>Sinonovacula constricta</i>	SGGSTMFPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	360
Consensus	sgg tm pgiadr qkei talapstmkiki iapperky svwiggsilaslstfqqmwisk	
<i>Loligo pealei</i>	QEYDESGPSIVHRKCF	375
<i>Chlamys farreri</i>	QEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Crassostrea ariakensis</i>	QEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Crassostrea gigas</i>	QEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Haliotis diversicolor</i>	QEYDESGPSIVHRKCF	375
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	QEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Pinctada fucata</i>	QEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Sinonovacula constricta</i>	QEYDESGPSIVHRKCF	376
Consensus	qeydesgpsivhrkcf	

图3 缢蛭与其它软体动物的  $\beta$ -actin 氨基酸的多序列比对结果

Fig. 3 Alignment of amino acid sequences of  $\beta$ -actin from *S. constricta* and other species

方框部分表示缢蛭特异的氨基酸残基,保守序列用下划线表示。

The special amino acid residues of *S. constricta* are shaded, conserved sequences are underlined.

*Loligo pealei*: 鱿鱼 (AAU11523.1); *Chlamys farreri*: 栉孔扇贝 (AAP88387.1); *Crassostrea ariakensis*: 近江牡蛎 (ABW97741.1); *Crassostrea gigas*: 太平洋牡蛎 (BAB84579.1); *Haliotis diversicolor*: 鲍鱼 (ABY87412.1); *Pinctada fucata*: 合浦珠母贝 (ACD99707.1); *Mizuhopecten yessoensis*: 虾夷扇贝 (ABG78596.1); *Sinonovacula constricta*: 缢蛭 (HQ693080)。

基于  $\beta$ -actin 氨基酸序列采用 MEGA 4.0 软件以 NJ 法构建了 17 种动物的系统进化树 (图 4), 缢蛭与软体动物门的其他物种聚在一起, 然后与节肢动物聚在一起, 再依次与脊椎动物的鱼类、两栖类、哺乳类聚在一起。

#### 2.4 缢蛭 $\beta$ -ACTIN 1 基因的表达分析

以 18S rRNA 为内参基因, 荧光定量 PCR 检测缢蛭  $\beta$ -ACTIN 1 基因在水管、鳃、斧足、外套膜、肝脏、性腺 6 个组织中的表达。结果显示,

$\beta$ -ACTIN 1 基因在 6 个组织中表达存在较大差异, 水管、斧足、外套膜、肝脏、性腺 5 个组织分别与鳃组织中的表达量相比, 表达量达到显著差异或者极显著差异 (图 5)。在鳃弧菌诱导 12 h 后, 正常组和诱导组分别在水管、鳃、斧足、外套膜、肝脏、性腺 6 个组织表达结果显示, 除在斧足中表达量上调外, 在其他组织中的表达量均下调, 而且存在显著差异或者极显著差异 (图 6)。以上结果表明, 本  $\beta$ -actin 基因不适合作为内参基因。

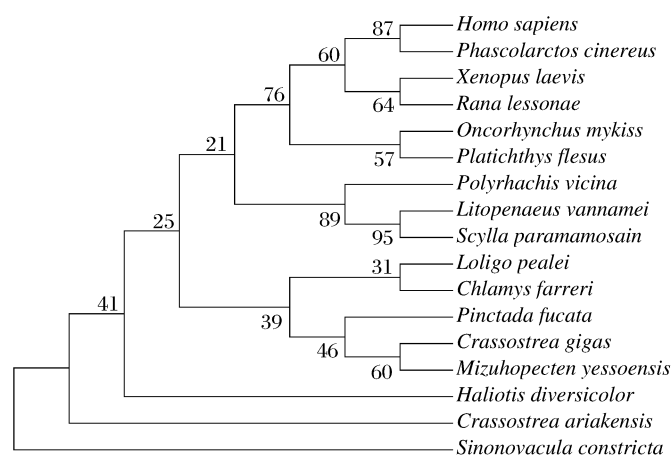


图4 根据  $\beta$ -actin 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

Fig.4 NJ phylogenetic tree of  $\beta$ -actin of species

*Homo sapiens*: 人 (NP\_001092.1); *Phascolarctos cinereus*: 澳洲树袋熊 (AAY53911.1); *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾 (NP\_001082422.1); *Rana lessonae*: 莱桑池蛙 (AAQ18432.1); *Oncorhynchus mykiss*: 虹鳟 (NP\_001117707.1); *Platichthys flesus*: 川鲮 (AAF63665.1); *Polyrhachis vicina*: 拟黑刺多蚁 (ACX37099.1); *Litopenaeus vannamei*: 凡纳滨对虾 (AAG16253.1); *Scylla paramamosain*: 拟穴青蟹 (ADG03642.1); *Loligo pealei*: 魷 (AAU11523.1); *Chlamys farreri*: 栉孔扇贝 (AAP88387.1); *Crassostrea ariakensis*: 近江牡蛎 (ABW97741.1); *Crassostrea gigas*: 太平洋牡蛎 (BAB84579.1); *Haliotis diversicolor*: 鲍 (ABY87412.1); *Pinctada fucata*: 合浦珠母贝 (ACD99707.1); *Mizuhopecten yessoensis*: 虾夷扇贝 (ABG78596.1); *Sinonovacula constricta*: 缢蛏 (HQ693080)。

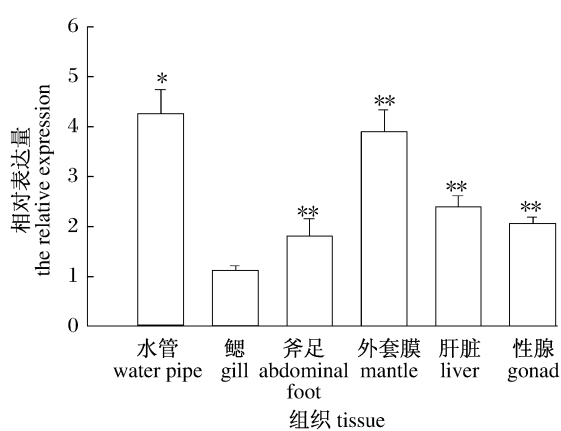


图5 基于荧光定量 PCR 检测的  $\beta$ -ACTIN 1

基因在各组织中的表达水平

\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

Fig.5  $\beta$ -ACTIN 1 gene mRNA expression level in different tissues detected by qRT-PCR

\* mean significant ( $P < 0.05$ ), \*\* mean great significant ( $P < 0.01$ ).

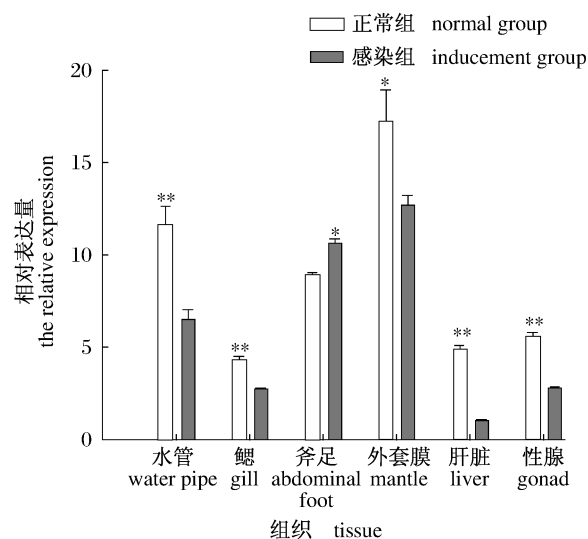


图6 基于荧光定量 PCR 检测的  $\beta$ -ACTIN 1 基因

在鳃弧菌感染 12 h 后的表达水平

\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

Fig.6  $\beta$ -ACTIN 1 gene mRNA expression level in different tissues after the *V. anguillarum* induced 12 hours detected by qRT-PCR

\* mean significant ( $P < 0.05$ ), \*\* mean great significant ( $P < 0.01$ ).

### 3 讨论

肌动蛋白是真核生物中广泛存在的一种蛋白质,是微丝的结构成分,其单体外观呈哑铃状。肌动蛋白与原肌球蛋白、肌钙蛋白组成细丝,细丝与由肌球蛋白组成的粗丝有规律地交替排列组成肌

原纤维。当细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高到一定程度时,肌动蛋白与肌球蛋白相互作用,产生肌球蛋白,催化 ATP 水解产生的能量使细丝沿粗丝滑动,即

为肌肉收缩<sup>[19-20]</sup>。研究表明,肌动蛋白的含量直接影响着肉质的好坏,不同产地的缢蛭其肉质品质不同,与其体内肌动蛋白的含量有着密切的关系<sup>[20-21]</sup>。肌动蛋白参与了广泛和复杂的生命活动,是生物体内必不可少并有重要研究价值的蛋白,因此值得对其进行更深入的研究。

actin 可以粗略地分为  $\alpha$  和  $\beta$  两种类型,其中  $\beta$  类 actin 是横纹肌纤维中的一种主要蛋白质成分,也是肌肉细丝及细胞骨架微丝的主要成分。目前,对软体动物  $\beta$ -actin 基因的研究主要集中在海水贝类<sup>[22]</sup>,如太平洋牡蛎<sup>[7,23]</sup> (*Crassostrea gigas*)、大西洋深水扇贝<sup>[24]</sup> (*Placopecten magellanicus*)、欧洲笠螺<sup>[25]</sup> (*Patella vulgate*)、虹鲍<sup>[26]</sup> (*Haliotis iris*)、虾夷扇贝<sup>[27]</sup> (*Mizuhopecten yessoensis*)、皱纹盘鲍<sup>[28-29]</sup> (*Haliotis discus hannai*)等。本次推导得到的缢蛭  $\beta$ -actin 氨基酸序列不但与太平洋牡蛎、合浦珠母贝、虾夷扇贝等软体动物具有很高的相似性,而且与凡纳滨对虾、拟穴青蟹、虹鳟、川鲈等水产经济动物也有很高的相似性,与澳洲树袋熊、人等高等脊椎动物的相似性也高达 97% 以上,这符合  $\beta$ -actin 基因氨基酸编码区高度保守的特点<sup>[12,30]</sup>,可能与它参与构成细胞骨架等重要生理功能密切相关。

ClustalX 比对结果显示,缢蛭  $\beta$ -ACTIN 1 基因的氨基酸序列与其他 7 种软体动物的同源序列存在着一定差异,具体表现在 Ile179、Glu229、Ser232、Pro236、Ile248、Asn272、Cys273、Val283、Ser320、Ser325、Val330、Pro339 等 12 个氨基酸残基具有特异性。此外,序列比对还发现了一些高变异位点,在第 229 位共有 4 种不同的氨基酸残基;在第 154、262、272、273、324 位分别存在 3 种不同的氨基酸残基。这些特殊位点的存在,说明  $\beta$ -actin 基因可以作为动物系统发育分析的分子标记<sup>[31-32]</sup>。建树结果显示,缢蛭  $\beta$ -actin 基因分子进化地位与缢蛭的生物学分类地位一致。

$\beta$ -actin 基因一直以来被作为内参基因广泛应用于基因 mRNA 的相对表达实验。在贝类的分子生物学研究中, $\beta$ -actin 基因是最常用的内参基因,如栉孔扇贝<sup>[33]</sup> (*Chlamys farreri*)、皱纹盘鲍<sup>[28-29]</sup> (*H. discus hannai*)、海湾扇贝<sup>[34]</sup> (*Agrapecten irradians*)等,且表达稳定。另外,WANG 等<sup>[22]</sup>研究表明,在合浦珠母贝中进行的实时定量 RT-PCR 检测中,肌动蛋白在攻毒前后

的合浦珠母贝血细胞中的表达无显著差异。但是近年来也有研究认为, $\beta$ -actin 基因不适合作为内参基因<sup>[13-14]</sup>。 $\beta$ -actin 在不同的外界环境或生理条件下,其表达水平可能存在显著的差异<sup>[35-36]</sup>,例如 SARMIENTO 等<sup>[37]</sup>对广温性的鲤 (*Cyprinus carpio*)进行冷适应机制的研究中发现, $\beta$ -actin 基因的表达水平在冬季和夏季存在显著性差异;BARRALLO 等<sup>[38]</sup>利用 Northern blot 和组织原位杂交对斑马鱼 (*Danio rerio*) $\beta$ -actin 基因的表达研究表明, $\beta$ -actin 基因在脑神经细胞增殖时有过表达的现象。同时在生物不同的生长阶段  $\beta$ -actin 基因的表达量也有所不同<sup>[39]</sup>,如 SELLARS 等<sup>[40]</sup>采用实时荧光定量 PCR 检测  $\beta$ -actin 基因在日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)不同发育时期的表达量显示, $\beta$ -actin 基因在一系列发育过程中的表达量有显著差异。 $\beta$ -actin 基因受某些疾病的影响表达量也有所不同<sup>[12,41]</sup>,如 GUTALA 等<sup>[42]</sup>利用实时荧光定量 PCR 检测  $\beta$ -actin 基因在人脑中的表达发现,阿尔茨海默病人 (Alzheimer's disease)与正常人的表达情况有所不同。这些都说明在利用  $\beta$ -actin 基因作为内参进行基因表达研究时,首先要对其作为分子内参的可靠性进行评估。本实验从荧光定量 PCR 检测得到的结果表明,缢蛭  $\beta$ -ACTIN 1 基因在各组织中的表达及在细菌诱导后的表达均不稳定,存在显著差异或者极显著差异,因此本实验缢蛭  $\beta$ -actin 基因不适合作为基因表达的内参基因。

#### 参考文献:

- [1] WELCH M D, HOLTZMAN D A, DRUBIN D G. The yeast actin cytoskeleton [J]. *Cur Opin Cell Biol*, 1994, 6(1): 110-119.
- [2] SHETERLINE P, SPARROW J. Protein profile, actin [M]. London: Academic Press, 1994: 1-62.
- [3] STAIGER C J, SCHLIWA M. Actin localization and function in higher plants [J]. *Protoplasma*, 1987, 141(1): 1-12.
- [4] POLLARD T D, COOPER J A. Actin and actin binding proteins: A critical evaluation of mechanisms and functions [J]. *Annu Rev Biochem*, 1986, 55: 987-1035.
- [5] RUBENSTEIN P A. The functional importance of multiple actin isoforms [J]. *Bio Essays*, 1990, 12(7): 309-315.
- [6] KABSCH W, VANDEKERCKHOVE J. Structure

- and function of actin[J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*,1992,21:49-76.
- [7] CADORET J P, DEBON R, CORNUDELLA L, *et al.* Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized action gene from the oyster *Crassostrea gigas*[J]. *FEBS Lett*,1999,460:81-85.
- [8] VALENTIJN K, VALENTIJN J A, JAMIESON J D. Role of actin in regulated exocytosis and compensatory membrane retrieval; insights from an old acquaintance [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1999,266(3):652-661.
- [9] 冯浩,成嘉,骆剑. 青鱼基因克隆及其启动子功能的初步检测[J]. *遗传学报*,2006,33(2):133-140.
- [10] CARLINI D B, REECE K S, GRAVE J E. Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods(Mollusca;Cephalopoda)[J]. *Molecular Biology and Evolution*,2000(17):1353-1370.
- [11] 林群,梁旭方,王琳,等. 近江牡蛎等7种养殖鱼虾贝类参照基因  $\beta$ -肌动蛋白 cDNA 序列的克隆与比较分析[J]. *生态毒理学报*,2008,3(3):256-261.
- [12] ZHONG H, JONATHAN W S. Direct Comparison of GAPDH,  $\beta$ -actin, Cyclophilin and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,1999,259(3):523-526.
- [13] RUAN W J, LAI M D. Actin, a reliable marker of internal control[J]. *Clinica Chimica Acta*,2007,385(1-2):1-5.
- [14] SELVEY S, THOMPSON E W, MATTHAEI K, *et al.*  $\beta$ -actin-an unsuitable internal control for RT-PCR[J]. *Molecular and Cellular Probes*,2001,15(5):307-311.
- [15] 徐凤山,张素萍. 中国海产双壳贝图志[M]. 北京:科学出版社,2008:211-213.
- [16] FENG B B, DONG L L, NIU D H, *et al.* Identification of immune genes of the Agamaki clam (*Sinonovacula constricta*) by sequencing and bioinformatic analysis of ESTs[J]. *Mar Biotechnol*,2010,12:282-291.
- [17] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acids Symp Ser*,1999,41:95-98.
- [18] RUBENSTEIN P A. The functional importance of multiple actin isoforms [J]. *Bio Essays*,1990,12(7):309-315.
- [19] 罗军. 肌肉纤维特性研究进展[J]. *中国牛业科学*,1989(4):36-40.
- [20] 章梁,侯温甫,黄泽元. 肌原纤维特性及其在鱼肉制品加工中的应用[J]. *武汉工业大学学报*,2008,27(4):19-22.
- [21] 闵连吉,李苏龙,张宏城. 肌原纤维和肉的保水性[J]. *肉类研究*,1991(2):5-8.
- [22] WANG Z L, WU Z H, JIAN J C, *et al.* Cloning and expression of an actin gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) [J]. *Marine Genomics*,2008,1:63-67.
- [23] MIYAMOTO H, HAMAGUCHI M, OKOSH K. Analysis of genes expressed in the mantle of oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Fish Sci*,2002,68(3):651-658.
- [24] PATWARY M U, REITH M, ENCHINGTON L K. Isolation and characterization of cDNA encoding an actin gene from the sea scallop (*Placopecten maggelanicus*) [J]. *Journal of Shellfish Research*,1996,15:265-279.
- [25] VAN LOON A E, GOEDEMAN H J, DAEME A J J M, *et al.* Actin genes expressed during early development of *Patella Vulgate*[J]. *Roux Archives of Developmental Biology*,1993,202:77-84.
- [26] MAXINE J, HEATHER J F, FRANK Y T. Isolation, characterization and expression analysis of three actin genes in the New Zealand black-footed abalone, *Haliotis iris* [J]. *Mar Biotechnol*,2006,8(2):110-119.
- [27] 刘卫东,赫崇波,刘彤,等. 虾夷扇贝肌动蛋白基因 cDNA 序列克隆与分析[J]. *水产科学*,2008,27(10):519-522.
- [28] 张志峰,茅云翔,潘洁,等. 皱纹盘鲍肌动蛋白基因启动子的克隆和序列分析[J]. *水产学报*,2001,25(5):398-401.
- [29] MA H M, XU W, MAI K S, *et al.* Cloning and characterization of an abalone (*Haliotis discus hannai*) actin gene[J]. *Journal of Ocean University of China(Oceanic and Coastal Sea Research)*,2004,3(2):145-149.
- [30] MA H M, MAI K S, LIU F Z G, *et al.* Cloning and characterization of an actin gene of *Chlamys farreri* and the phylogenetic analysis of mollusk actins[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*,2007,25(3):304-309.
- [31] LEE J S, LEE S H, GYE M C, *et al.* The  $\beta$ -actin gene of two species of southern top mouth minnow (*Pseudorasbora parva*) and the common fat minnow



- (*Rhynchocypris oxycephalus*) from the family cyprinidae[J]. DNA Sequence, 2000, 11(3-4): 301-307.
- [32] HWANG U W, HNA M S, KIM I C, *et al.* Cloning and sequences of  $\beta$ -actin genes from *Rhodeus notatus* and the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Cyprinidae) and the phylogeny of cyprinid fishes inferen from  $\beta$ -actin genes [J]. DNA Sequence, 2002, 13(3): 153-159.
- [33] 胥炜, 王昊, 宋林生, 等. 栉孔扇贝 C 型凝集素基因的克隆与表达研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(1): 83-88.
- [34] 刘维青. 海湾扇贝金属硫蛋白 cDNA 序列克隆及其在镉和鳗弧菌诱导下的表达研究[D]. 中国海洋大学硕士学位论文, 2004.
- [35] 段化伟, 谢克勤, 张翠丽, 等. 氯丙烯对大鼠大脑神经元中  $\beta$ -actin 的影响[J]. 卫生毒理学杂志, 2004, 18(3): 131-133.
- [36] 梁赞姜, 汲坤, 王立军. 大鼠不同脏器  $\beta$ -actin mRNA 稳定性差异的实验研究[J]. 锦州医学院学报, 2006, 6(3): 11-13.
- [37] SARMIENTO J, LEAL S, QUEZADA C, *et al.* Environmental acclimatization of the carp modulates the transcription of beta-actin [J]. J Cell Biochem, 2000, 80(2): 223-228.
- [38] BARRALLO A, GONZALEZ-SARMENTO R, GARCIA-ISIDORO M, *et al.* Differential brain expression of a new beta-actin gene from zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Eur J Neurosci, 1999, 11(1): 369-372.
- [39] MOSHIER J A, CORNELL T, MAJUMDAR A P. Expression of protease genes in the gastric mucosa during aging [J]. Experimental Gerontology, 1993, 28(3): 249-258.
- [40] SELLARS M J, VUOCOLO T, LEETON L A, *et al.* Real-time RT-PCR quantification of Kuruma shrimp transcripts; a comparison of relative and absolute quantification procedures [J]. J Biotechnol, 2007, 129(3): 391-399.
- [41] GLARE E M, DIVJAK M, BAILEY M J, *et al.*  $\beta$ -actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalizing mRNA levels [J]. Thorax, 2002, 57(9): 765-770.
- [42] GUTALA R V, REDDY P H. The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains [J]. J Neurosci Methods, 2004, 132(1): 101-107.

## Molecular characteristics and expression analysis of $\beta$ -ACTIN 1 gene from *Sinonovacula constricta*

FENG Bing-bing<sup>1</sup>, ZHONG Yu-min<sup>1</sup>, NIU Dong-hong<sup>1</sup>, CHEN Hui<sup>2</sup>, LIN Guo-wen<sup>2</sup>, LI Jia-le<sup>1,3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. Mindong Fisheries Research Institute, Ningde 352100, China;

3. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The normalized cDNA library from liver of *Sinonovacula constricta* was constructed using the SMART cDNA construction kit and large numbers of colonies were randomly picked and sequenced. Two EST sequences with high homology with  $\beta$ -actin gene of other species were found and then the complete express sequence of one from *S. constricta* was obtained by PCR and 5' RACE, named  $\beta$ -ACTIN 1. The cDNA of this gene was 1 552 bp, which consists of a 73 bp 5' untranslated region(UTR), a 1 131 bp open reading frame(ORF) and a 348 bp 3' UTR. The translated protein is composed of 376 amino acids, with 41.95 ku molecular weight, and its calculated isoelectric point was 5.23. Compared with the other 7 molluscs of amino acid sequences, the amino acid sequence of  $\beta$ -ACTIN 1 in *S. constricta* has twelve specific amino acid residues: Ile179, Glu229, Ser232, Pro236, Ile248, Asn272, Cys273, Val283, Ser320, Ser325, Val330, Pro339, respectively. Meanwhile, the amino acids sequence of  $\beta$ -ACTIN 1 in *S. constricta* shared the high similarity with the other 7 molluscs (more than 97%). Phylogenetic analysis suggested that *S. constricta* clustered with mollusca firstly, and then clustered with arthropoda, finally clustered with fish, amphibians, mammals. The quantitative reverse transcriptase (qRT-PCR) analyses showed that the expression level of  $\beta$ -ACTIN 1 gene was not stable in different tissues and after the *Vibrio anguillarum* induced in *S. constricta*. So this  $\beta$ -actin gene was not suitable as an internal control.

**Key words:** *Sinonovacula constricta*; cDNA library;  $\beta$ -ACTIN 1 gene; sequence analysis; gene expression

**Corresponding author:** LI Jia-le. E-mail: jlli@shou.edu.cn